

Read instructions carefully before starting test

Veratox[®] for Chloramphenicol

Quantitative Test

REFRIGERATE AT 2–8°C (35–46°F) • DO NOT FREEZE

CHLORAMPHENICOL

Chloramphenicol was among the first broad-spectrum antibiotics. It was isolated from *Streptomyces venezuelae* in 1947, and its chemical structure was elucidated shortly thereafter. The relatively simple structure allows the compound to be produced cheaply by completely synthetic methods. It is bacteriostatic against a range of gram-positive and gram-negative bacteria. However, serious side-effects related to suppression of bone marrow activity are observed in patients undergoing treatment with chloramphenicol. Some of the side effects are dose related and reversible upon ending treatment. The most serious side-effect, potentially fatal aplastic anemia, may develop after ending treatment and is unrelated to dose.

Because of the side-effects, chloramphenicol is generally not prescribed in developed countries where alternative antibiotics are readily available. Chloramphenicol is banned for use in production of food animals in the United States, Canada, and the European Union. However, it continues to be used in some countries due to its broad-specificity, availability, and low cost.

INTENDED USE

This test is intended for quantitative determination of chloramphenicol in shrimp or honey. Positive samples should be confirmed using an instrumental method such as mass spectrometry.

INTENDED USER

This kit is intended for use by laboratory personnel familiar with the analysis of chloramphenicol in shrimp or honey. The method requires extraction of the shrimp tissue or honey with an organic solvent. The user should be experienced in the use of immunosorbent assays (ELISA). Good technique is important for obtaining accurate results.

ASSAY PRINCIPLES

Veratox for Chloramphenicol is an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The basis of this test is a competition between a chloramphenicol-enzyme conjugate and any free chloramphenicol from the sample for a limited number of binding sites on the antibody-coated microplate wells.

Samples are extracted, and the extracts (and solutions of chloramphenicol standards) are added to the microplate wells. A solution of the chloramphenicol-enzyme conjugate is also added to each of the wells. At this point, time is allowed for any free chloramphenicol and the chloramphenicol-enzyme conjugate to compete for the binding sites on the plate. Next, the plate is washed to remove unbound material and a substrate solution is added to each well. During an ensuing reaction period, any bound enzyme conjugate reacts with the substrate to produce a blue-colored solution. The color-forming reaction is terminated by adding Stop Solution to the wells of the plate, turning the blue color to yellow. The absorbance of each well is then measured using a microplate reader set at 450 nm.

The extent of color formation is inversely proportional to the amount of chloramphenicol present in that well. Samples that contain little or no chloramphenicol will have a relatively large absorbance while a sample that contains more chloramphenicol will have a smaller absorbance. Quantitative results may be obtained by comparing the absorbance of the samples to a standard curve generated from the wells containing the chloramphenicol standards.

STORAGE REQUIREMENTS

This kit can be used until the expiration date on the label when stored at 2–8°C (35–46°F). Do not freeze.

MATERIALS PROVIDED

1. 1 plate (96 wells) of antibody-coated microwells
2. 1 vial of chloramphenicol 0.0 ng/mL standard, 2 mL
3. 1 vial of chloramphenicol 0.02 ng/mL standard, 2 mL
4. 1 vial of chloramphenicol 0.05 ng/mL standard, 2 mL
5. 1 vial of chloramphenicol 0.1 ng/mL standard, 2 mL
6. 1 vial of chloramphenicol 0.5 ng/mL standard, 2 mL
7. 1 vial of chloramphenicol 2 ng/mL standard, 2 mL
8. 1 bottle of ready-to-use chloramphenicol enzyme conjugate, 20 mL
9. 1 bottle of sample dilution buffer, 100 mL
10. 1 bottle of wash buffer concentrate, 100 mL (dilute 1:10 with deionized water before use)
11. 1 bottle of substrate solution, 28 mL
12. 1 bottle of stop solution, 28 mL

MATERIALS REQUIRED BUT NOT PROVIDED

1. Pipettor, 100 µL (Neogen item #9272)
2. Pipettor, multichannel, 100 µL
3. Pipette tips for 100 µL and multichannel pipettors (Neogen item #9410)
4. 3 reagent boats for multichannel pipettor
5. Paper towels or equivalent absorbent material
6. Pipettor capable of measuring 1.0 mL
7. Pipettor capable of measuring 0.5 mL (for isooctane/chloroform)
8. Graduated or volumetric pipettor capable of measuring 6.0 mL of solvent
9. Disposable pipettes capable of measuring 4.0 mL of solvent
10. Glass test tubes capable of being centrifuged at 2,000 g (16 x 100 mm preferred)
11. Caps for glass test tubes
12. Ethyl Acetate (ACS reagent grade or better)
13. Chloroform
14. Isooctane (2,2,4-trimethylpentane)
15. Deionized or distilled water
16. Blender or food processor
17. Centrifuge capable of 2,000 g, swinging bucket rotor preferred
18. Heating block
19. Compressed air or nitrogen and necessary tubing
20. Water bath
21. Vortex

22. Automated plate washer
23. Microplate reader with 450 nm filter (650 nm reference filter is optional)
24. Balance capable of measuring 3.0 g
25. Timer (Neogen item #9426)
26. Graduated cylinder to dilute wash buffer
27. Waterproof marker
28. Pipette aid for dispensing solvents
29. Stainless steel spatulas for transferring shrimp into test tubes
30. Thermometer

PRECAUTIONS

1. Do not use components beyond expiration date.
2. Store test kit at 2–8°C (35–46°F) when not in use. Do not freeze test kits.
3. Avoid prolonged storage of kits at ambient temperatures.
4. Prior to performing the test, allow ELISA kit components, standards, and samples to reach room temperature (20–23°C, 68–74°F). This usually takes about 60 minutes.
5. Do not mix reagents from one kit lot with reagents from a different kit lot.
6. Use aseptic technique when opening and removing reagents from vials and bottles.
7. Always pour substrate out of the bottle into a clean reagent boat. Do not pipette out of the bottle. Unclean tips can contaminate the substrate. Do not put excess substrate back into the bottle.
8. Do not pipette reagents by mouth. Always use clean pipette tips for the buffer, enzyme conjugate, standards, and samples.
9. All specimens should be considered potentially hazardous. Exercise proper handling precautions.
10. The plate wells are for single use only. Each well can accommodate only one sample or standard. Do not reuse wells.
11. Use of incubation times other than those specified may give inaccurate results.
12. Most of the reagents contain anti-microbial preservatives. Avoid skin contact. If contact occurs, flush immediately with water.
13. Avoid contacting skin or eyes with stop solution. In case of contact, rinse with large amounts of water.
14. Do not smoke, eat, or drink in areas where specimens or reagents are being handled.
15. Dispose of reagents in accordance with all applicable governmental regulations.

PROCEDURAL NOTES

1. Allow the strips to warm to room temperature (20–23°C, 68–74°F) before removing them from the foil pouch.
2. Keep wells sealed in the foil pouch until needed. Remove wells from the foil pouch only after the samples are extracted and the test procedure is set to begin.
3. Desiccant bag must remain sealed in the foil pouch with unused strips. Remove excess air before sealing.
4. Dispense only the amounts of enzyme conjugate and substrate needed for immediate testing into clean vessels. From these vessels, pipette to the wells of the plate. **Do not put excess reagents back into original bottles.** Contamination of these reagents may cause enzyme conjugate degradation or premature development of blue color in the substrate.
5. Before opening the standards vials, tap vials in an upright position to remove any liquid in the cap.
6. The standards provided with the kit are ready to use. Do not dilute the standards in the same manner as sample extracts.
7. Before pipetting a reagent, prime the pipette tip once with that reagent (i.e. fill the tip with the desired amount of reagent and dispense back into the same vial and repeat).
8. When pipetting into the wells, do not allow the pipette tip to touch the inside of the well or any of the reagents already in the well.
9. Timing and speed of reagent addition can influence performance of the test. This is especially true for the addition of substrate and stop solution. Substrate and stop solution should be applied to the plate wells as quickly as possible, preferably with a multichannel pipettor.
10. A good wash step is critical to achieving good well-to-well reproducibility. All liquid must be removed from the wells before applying substrate. After washing, the plate should be tamped on absorbent paper to remove any remaining residue.

EXTRACTION OF SHRIMP TISSUE

1. Remove the heads and shells from the shrimp to be tested. Grind at least 5 shrimp (≥ 50 g) in a blender or food processor for approximately 1 minute or until the material appears to be a uniform paste.
2. Weigh 3.0 g of the blended tissue into a glass tube.
Optional: Centrifuge the tube briefly (approximately 200 g for 2 minutes to transfer the tissue into the bottom of the tube).
3. Add 6 mL of ethyl acetate to the tube. Using a stainless steel spatula, scrape the tissue off the walls of the tube and break up any large aggregates. All of the tissue should be suspended in the solvent.
4. Cap the tube, and vortex the tube vigorously for 30 seconds.
5. Centrifuge the tube for 10 minutes at approximately 700 g.
6. Remove 4 mL of the ethyl acetate layer, and transfer it to a clean glass tube.
7. Evaporate the ethyl acetate to just dryness at 80°C using compressed air or nitrogen and a heating block.
8. Add 0.5 mL of 2:3 isooctane/chloroform (v/v), and vortex briefly to ensure all of the residue is lifted off the walls of the tube.
9. Add 1.0 mL sample dilution buffer and vortex for 10 seconds. A longer vortex time promotes the formation of emulsions.
10. Centrifuge the tube for 10 minutes at 2,000 g.
NOTE: After step 10, if there is no distinct separation of layers or the upper layer remains an emulsion, heat the tube briefly (≤ 5 min) in a water bath at 80°C. (Loosely cap the tube to avoid evaporating the contents.) Then centrifuge again for 10 min at 2000 g and proceed with step 11.
11. The upper layer is the aqueous solution. Carefully pipette 100 μ L portions of this layer into the wells of the plate for the test. It is important that none of the solvent or emulsion is transferred during this process.

EXTRACTION OF HONEY

1. Weigh 3.0 g of honey and place into a tube.
2. Add 3.0 mL of water. Cap the tube and vortex for 30 seconds, or until the honey is dissolved to form a uniform solution.
3. Add 6.0 mL ethyl acetate to the tube.
4. Place the tube on a rocker or similar mixer and mix gently for 10 minutes.
5. Centrifuge the tube for 5 minutes at approximately 700 g.
6. Remove 2.0 mL of the ethyl acetate phase (upper layer) and transfer it to a clean glass tube.
7. Evaporate the ethyl acetate until just before dry at 80°C using compressed air or nitrogen and a heating block.
8. Add 1.0 mL sample dilution buffer and vortex for 30 seconds. The residue will not completely dissolve, but it must be suspended and dispersed in the buffer. If necessary, allow the residue to soak for a few minutes and vortex until the residue is broken up and suspended. If the honey is crude or may contain pieces of the comb, see note below.
9. Carefully pipette 100 μ L of the solution into the wells of the plate for the test.
NOTE: Raw honey may contain a significant amount of fatty compounds from the comb. In this case, after evaporating the ethyl acetate (Step 7) add 0.5 mL of 2:3 isooctane/chloroform (v/v) to the residue and vortex for 10 seconds. Then add 1.0 mL sample dilution buffer and vortex for 10 seconds. Centrifuge the tube for 10 minutes at 2000 g. Carefully pipette 100 μ L of the aqueous (upper) layer into the wells of the plate for the test. This treatment is only necessary for fatty samples, but can be done for any sample.

TEST PROCEDURE

1. Dilute wash buffer concentrate ten-fold with deionized water (i.e. 20 mL of wash buffer concentrate plus 180 mL of deionized water). Mix thoroughly.
2. Determine the number of wells to be used. Remove unneeded strips from the plate holder, and return them to the foil pouch.
3. Add 100 μ L of sample or standards to the appropriate wells in duplicate.
NOTE: Do not dilute the provided standards. **Wait 10 minutes before proceeding to Step 4.**
4. Add 100 μ L of diluted enzyme conjugate to each well. Use an multi-channel pipettor for rapid addition.
5. Incubate at room temperature for 10 minutes.
NOTE: Keep plate away from drafts and temperature fluctuations.

6. After the incubation is complete, dump the liquid from the wells. Tamp the plate on a clean lint-free towel to remove any liquid remaining in the wells.
7. Wash each well with 300 μ L of diluted wash buffer. For manual wash procedures repeat for a total of 3 washings, invert and tap dry between each washing. If an automated plate washer is used, wash the plate 3 times with 300 μ L of diluted wash buffer. After completing the last wash step, tamp the plate on a clean lint-free towel to remove any liquid remaining in the wells, and wipe the bottom of the wells with a lint-free towel to remove any liquid on the outside of the wells.
8. Add 100 μ L of the substrate solution to each well. Use a multi-channel pipettor for best results.
9. Incubate at room temperature for 10 minutes. Gently shake plate periodically.
10. Add 100 μ L of stop solution to each well to stop the reaction. Use a multi-channel pipettor for best results. Mix by shaking plate gently.
11. Measure the absorbance of each well at 450 nm using a microplate reader.

INTERPRETATION OF RESULTS

Calculate the average of the duplicate absorbance values for each standard and sample. Express the mean absorbance (B) of each sample and standard as a fraction relative to the mean absorbance of the 0.0 ng/mL standard (B_0). Do this by dividing each value by the absorbance of the 0.0 ng/mL standard (B/B_0). The 0.0 ng/mL standard will become 1.0.

Prepare a calibration curve by plotting $\log(B/B_0)$ versus $\log(\text{chloramphenicol concentration})$ for each of the standards. Using the value of $\log(B/B_0)$ for each sample, the concentration of chloramphenicol in each sample as ng/mL can be read or calculated from the curve. To account for the extraction procedure, the result must be multiplied by 500 to express the result as pg/g tissue (ppt).

SPECIFICITY AND SENSITIVITY

The specificity was determined by testing the cross-reactivity of related compounds.

Compound	Cross reactivity
Chloramphenicol	100%
Chloramphenicol succinate	130%
Chloramphenicol glucuronide	26%
Chloramphenicol base	< 0.01%
Florfenicol	< 0.01%
Thiamphenicol	< 0.01%

The lower limit of detection is approximately 0.02 ng/mL. This is the lowest concentration that can be determined to be significantly different from the zero standard under ideal conditions. Allowing for the extraction, this is equivalent to 10 ppt (pg/g) in shrimp tissue. Care should be taken in selecting an appropriate cutoff value.

Typical recovery rates using the recommended extraction procedure are $\geq 80\%$.

CUSTOMER SERVICE/TECHNICAL SUPPORT

Neogen Customer Assistance and Technical Service can be reached by using the contact information on the back of this booklet. Training on this product, and all Neogen test kits, is available.

MSDS INFORMATION AVAILABLE

Material safety data sheets (MSDS) are available for this test kit, and all of Neogen's Food Safety test kits, at www.neogen.com, or by calling Neogen at 800/234-5333 or 517/372-9200.

WARRANTY

Neogen Corporation makes no warranty of any kind, either expressed or implied, except that the materials from which its products are made are of standard quality. If any materials are defective, Neogen will provide a replacement product. Buyer assumes all risk and liability resulting from the use of this product. There is no warranty of merchantability of this product, or of the fitness of the product for any purpose. Neogen shall not be liable for any damages, including special or consequential damage, or expense arising directly or indirectly from the use of this product.

Lea las instrucciones detenidamente antes de comenzar el análisis

Veratox® **de Cloranfenicol**

Prueba Cuantitativa

REFRIGÉRESE A 2–8°C (35–46°F) • NO CONGELAR

CLORANFENICOL

El cloranfenicol fue uno de los primeros antibióticos de amplio espectro. Fue aislado de *Streptomyces venezuelae* en 1947 y poco tiempo después se aclaró su estructura química. La estructura relativamente sencilla permite que el compuesto se pueda producir de manera económica por métodos totalmente sintéticos. Es bacteriostático frente a una gama de bacterias grampositivas y gramnegativas. Sin embargo, se han observado graves efectos laterales relacionados con la supresión de actividad medular en pacientes que se encuentran en tratamiento con cloranfenicol. Algunos de estos efectos laterales están relacionados con la dosificación y son reversibles en cuanto se termina el tratamiento. El efecto lateral más grave, la anemia aplásica potencialmente mortal, se puede presentar después de terminar el tratamiento y no está relacionada con la dosificación.

Debido a estos efectos laterales, generalmente no se receta cloranfenicol en países desarrollados donde hay antibióticos alternativos fácilmente a la mano. El cloranfenicol está prohibido para utilizarse en la producción de animales para consumo en los Estados Unidos, Canadá y la Unión Europea. Sin embargo, continúa utilizándose en algunos países debido a su amplia especificidad, disponibilidad y bajo costo.

USO PREVISTO

Esta prueba está diseñada para la determinación cuantitativa de cloranfenicol en el camarón o la miel. Se deberán confirmar las muestras positivas utilizando un método instrumental como espectrometría de masas.

USUARIO PREVISTO

Este juego está diseñado para ser usado por personal de laboratorio familiarizado con el análisis de cloranfenicol en camarón o la miel. El método requiere la extracción de tejido del camarón o la miel con un disolvente orgánico. El usuario deberá tener experiencia en el uso de inmunoanálisis de adsorción (ELISA). Es importante utilizar una buena técnica para obtener resultados precisos.

PRINCIPIOS DEL ENSAYO

Veratox de Cloranfenicol es un enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA). La base de esta prueba es una competencia entre un conjugado de enzimas de cloranfenicol y cualquier cloranfenicol libre de la muestra en un número limitado de puntos de unión en los pozos de microplacas recubiertos de anticuerpos.

Se extraen las muestras y los extractos (junto con las soluciones de estándares de cloranfenicol) se agregan a los pozos de microplacas. También se agrega a cada uno de los pozos una solución del conjugado de enzimas de cloranfenicol. En este punto, se da tiempo para que cualquier cloranfenicol libre y el conjugado de enzimas de cloranfenicol compitan por los puntos de unión en la placa. Enseguida, se lava la placa para retirar el material no ligado y se agrega una solución de sustrato a cada pozo. Durante un período de reacción causado, cualquier conjugado de enzimas ligado reacciona con el sustrato para producir una solución de color azul. Se termina la reacción formadora de color al agregar solución quelante a los pozos de la placa, cambiando el color azul a amarillo. Entonces se mide la absorbencia de cada pozo utilizando un lector de microplacas a 450 nm.

La extensión de la formación de color es inversamente proporcional a la cantidad de cloranfenicol presente en dicho pozo. Las muestras que contienen poco o nada de cloranfenicol tendrán una absorbencia relativamente grande, mientras que una muestra que contiene más cloranfenicol tendrá una absorbencia más pequeña. Se pueden obtener resultados cuantitativos al comparar la absorbencia de las muestras a una curva estándar generada de los pozos que contienen los estándares de cloranfenicol.

REQUERIMIENTOS DE ALMACENAMIENTO

Este juego se puede usar hasta la fecha de vencimiento en la etiqueta cuando se almacena a 2–8°C (35–46°F). No congelar.

MATERIALES PROPORCIONADOS

1. 1 placa (96 pozos) de pocillos cubiertos de anticuerpos
2. 1 vial de estándar de cloranfenicol 0.0 ng/mL, 2 mL
3. 1 vial de estándar de cloranfenicol 0,02 ng/mL, 2 mL
4. 1 vial de estándar de cloranfenicol 0,05 ng/mL, 2 mL
5. 1 vial de estándar de cloranfenicol 0,1 ng/mL, 2 mL
6. 1 vial de estándar de cloranfenicol 0,5 ng/mL, 2 mL
7. 1 vial de estándar de cloranfenicol 2 ng/mL, 2 mL
8. 1 frasco de conjugado de enzimas de cloranfenicol listo para su uso, 20 mL
9. 1 frasco de tamponado para dilución de muestras, 100 mL
10. 1 frasco de concentrado de solución tamponada de lavado, 100 mL (Diluir 1:10 con agua desionizada antes de usarse)
11. 1 frasco de solución de sustrato, 28 mL
12. 1 frasco de solución quelante, 28 mL

MATERIALES QUE SE REQUIEREN QUE NO SE PROPORCIONAN

1. Pipeta, 100 µL (producto Neogen N° 9272)
2. Pipeta, multicanal, 100 µL
3. Puntas de pipeta para pipetas de 100 µL y multicanal (producto Neogen N° 9410)
4. 3 cubetas de reactivo para pipetas multicanal
5. Toallas de papel o material absorbente equivalente
6. Pipetas con capacidad para medir 1.0 mL
7. Pipetas con capacidad para medir 0.5 mL (para isoctano/cloroformo)
8. Pipeta graduada o volumétrica con capacidad para medir 6.0 mL de disolvente
9. Pipetas desechables con capacidad para medir 4.0 mL de disolvente
10. Tubos de ensayo de cristal con capacidad para centrifugado a 2000g (de preferencia de 16 x 100 mm)
11. Tapones para los tubos de ensayo de cristal
12. Acetato de etilo (grado reactivo ACS o superior)
13. Cloroformo
14. Isoctano (2,2,4-trimetilpentano)

15. Agua desionizada o destilada
16. Licuadora o procesador de alimentos
17. Centrífuga con capacidad de 2000 g, de preferencia con rotor de cubeta oscilante
18. Bloque térmico
19. Aire comprimido o nitrógeno y la tubería necesaria
20. Baño de agua
21. Vortex
22. Lavado de placas automático
23. Lector de microplacas con filtro de 450 nm (filtro de referencia de 650 nm opcional)
24. Báscula con capacidad para 3.0 g
25. Temporizador (producto Neogen N° 9426)
26. Cilindro graduado para diluir tamponado de lavado
27. Marcador a prueba de agua
28. Accesorio de pipeta para surtir disolventes
29. Espátulas de acero inoxidable para transferir el camarón a los tubos de ensayo
30. Termómetro

PRECAUCIONES

1. No utilice los componentes después de la fecha de vencimiento.
2. Guarde el juego de pruebas a 2–8°C (35–46°F) cuando no esté en uso. No congele los juegos de pruebas.
3. Evite el almacenamiento prolongado de los juegos a temperatura ambiente.
4. Antes de realizar la prueba, deje que los componentes del juego ELISA, los estándares y las muestras alcancen la temperatura ambiente, es decir, 20–23°C (68–74°F). Esto generalmente toma 60 minutos aproximadamente.
5. No mezcle los reactivos de un lote de juego con un con otro lote de juego.
6. Utilice una técnica aséptica para abrir y retirar los reactivos de los viales y los frascos.
7. Siempre vierta el sustrato del frasco dentro de una cubeta de reactivo limpia. No lo extraiga del frasco con pipeta. Las puntas no limpias pueden contaminar el sustrato. No regrese al frasco el exceso de sustrato.
8. No succione con la boca los reactivos de la pipeta. Siempre utilice puntas de pipeta limpias para el tamponado, conjugado de enzimas, estándares y muestras.
9. Todos los especímenes se deben considerar potencialmente peligrosos. Siga las precauciones de manipulación adecuadas.
10. Los pozos de placas son para un solo uso. Cada pozo solamente puede acomodar una muestra de estándar. No vuelva a utilizar los pozos.
11. El usar tiempos de incubación diferentes a los especificados puede producir resultados incorrectos.
12. La mayoría de los reactivos contienen preservativos antimicrobianos. Evite el contacto con la piel. En caso de producirse el contacto, enjuague con agua inmediatamente.
13. Evite el contacto de la solución quelante con la piel o con los ojos. En caso de producirse contacto, enjuague las áreas con agua en cantidades abundantes.
14. No fume, coma o beba en áreas donde se estén manipulando especímenes o reactivos.
15. Deseche los reactivos según todas las normas gubernamentales aplicables.

NOTAS DE PROCEDIMIENTO

1. Deje que la tiras se calienten a la temperatura ambiente (20–23°C, 68–74°F) antes de retirarlas de la bolsa de papel metalizado.
2. Mantenga los pozos sellados en la bolsa de papel metalizado hasta que se necesiten. Retire los pozos de la bolsa de papel metalizado solamente hasta que se hayan extraído las muestras y que esté listo para empezar el procedimiento de la prueba.
3. La bolsa de desecante debe permanecer sellada en la bolsa de papel metalizado con las tiras sin usar. Retire el exceso de aire antes de sellar.

4. Surta en los recipientes limpios solamente las cantidades de conjugado de enzimas y sustrato que sean inmediatamente necesarias para los ensayos. De los recipientes, vierta con pipeta a los pozos de la placa. **No regrese a sus frascos originales ningún excedente de reactivos.** La contaminación de estos reactivos puede provocar la degradación del conjugado de enzimas o un desarrollo prematuro de color azul en el sustrato.
5. Antes de abrir los viales de estándares, golpee los viales en posición vertical para retirar cualquier líquido que haya quedado en la tapa.
6. Los estándares que se proporcionan con el juego están listos para usarse. No diluya los estándares de la misma forma que hizo con los extractos de muestras.
7. Antes de surtir con pipeta un reactivo, cebe la punta de la pipeta una vez con dicho reactivo (por ejemplo, llene la punta con la cantidad deseada de reactivo y regréselo al mismo vial y repita nuevamente).
8. Cuando surta con pipeta dentro de los pozos, no deje que la punta de la pipeta toque la parte interior del pozo o cualquiera de los reactivos que ya están en el pozo.
9. El tiempo y la velocidad de la adición de reactivos pueden influir en el rendimiento del ensayo. Esto es particularmente cierto al agregar el sustrato y la solución quelante. El sustrato y la solución quelante se deben aplicar a los pozos de la placa tan pronto como sea posible, de preferencia con una pipeta de múltiples canales.
10. Es crítico realizar un buen paso de lavado para lograr una buena reproducibilidad de pozo a pozo. Se debe retirar todo el líquido de los pozos antes de aplicar sustrato. Después de lavar, la placa se debe apretar con papel absorbente para retirar cualquier residuo que haya quedado.

EXTRACCIÓN DE TEJIDO DEL CAMARÓN

1. Retire las cabezas y las conchas del camarón que se va a probar. Muela cuando menos 5 camarones (≥ 50 g) en una licuadora o un procesador de alimentos durante aproximadamente 1 minuto o hasta que el material parezca una pasta uniforme.
2. Pese 3.0 g del tejido molido dentro de un tubo de cristal.
Opcional: centrifugue brevemente el tubo (aproximadamente 200 g durante 2 minutos para transferir el tejido al fondo del tubo.)
3. Agregue 6 mL de acetato de etilo dentro del tubo. Utilice una espátula de acero inoxidable para raspar el tejido de las paredes del tubo y romper cualquier agregado grande. Todo el tejido debe quedar suspendido en el disolvente.
4. Tape el tubo y agítelo con el Vortex vigorosamente durante 30 segundos.
5. Centrifugue el tubo durante 10 minutos aproximadamente a 700 g.
6. Retire 4 mL de la capa de acetato de etilo y transfíralos a un tubo de cristal limpio.
7. Evapore el acetato de etilo a que quede seco a 80°C utilizando aire comprimido o nitrógeno y un bloque térmico.
8. Agregue 0.5 mL de 2:3 isoctano/cloroformo (v/v) y agítelo brevemente con Vortex para asegurar que todo el residuo se retire de las paredes del tubo.
9. Agregue 1.0 mL de tamponado para dilución de muestras y agítelo durante 10 segundos. Un tiempo de agitado en Vortex mayor promueve la formación de emulsiones.
10. Centrifugue el tubo durante 10 minutos a 2000 g.
NOTA: Después del paso 10, si no hay separación de capas distintas o si la capa superior permanece como emulsión, caliente brevemente el tubo (≤ 5 min) en un baño de agua a 80°C. (Tape el tubo si apretar para evitar que el contenido se evapore.) Después vuelva a centrifugar durante 10 min a 2000 g y proceda con el paso 11.
11. La capa superior es la solución acuosa. Traslade cuidadosamente con pipeta porciones de 100 μ L de esta capa dentro de los pozos de la placa para el ensayo. Es importante que durante este proceso no se transfiera nada del disolvente o de la emulsión.

EXTRACCIÓN DE MIEL

1. Pese 3,0 g de miel y colóquela en un tubo.
2. Agregue 3,0 ml de agua. Tape el tubo y sacúdalo durante 30 segundos, o hasta que la miel se disuelva y se forme una solución uniforme.
3. Agregue 6,0 ml de acetato de etilo al tubo.
4. Coloque el tubo en un agitador o en un mezclador similar y mezcle suavemente durante 10 minutos.
5. Centrifugue el tubo durante 5 minutos cuando alcance aproximadamente los 700 g.
6. Quite 2,0 ml de la capa de acetato de etilo (capa superior) y transfírela a un tubo de vidrio limpio.
7. Evapore el acetato de etilo hasta antes de que se seque a 80 °C, con aire comprimido o nitrógeno y un bloque calefactor.
8. Agregue 1,0 ml de tampón de dilución de muestra y sacuda durante 30 segundos. El residuo no se disolverá completamente, pero debe suspenderse y dispersarse en el tampón. Si fuera necesario, deje el residuo en remojo durante algunos minutos y sacúdalo hasta que se separe y quede suspendido. Si la miel está cruda o contiene trozos de panal, consulte la nota a continuación.
9. Pipetee cuidadosamente 100 µl de solución en los agujeros de la placa para la prueba.
NOTA: La miel cruda puede contener una cantidad significativa de compuestos grasos provenientes del panal. En este caso, después de evaporar el acetato de etilo (paso 7), agregue 0,5 ml de 2:3 isoocetano/ cloroformo al residuo y sacuda durante 10 segundos. Luego, agregue 1,0 ml de tampón de dilución de muestra y sacuda durante 10 segundos. Centrifugue el tubo durante 10 minutos cuando alcance los 2000 g. Pipetee cuidadosamente 100 µl de la capa acuosa (superior) en los agujeros de la placa para la prueba. Este tratamiento solo es necesario para las muestras grasas, pero se puede hacer con todas las muestras.

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA

1. Diluya en diez tantos el concentrado de tamponado de lavado con agua desionizada (por ejemplo, 20 mL de concentrado de tamponado de lavado más 180 mL de agua desionizada). Mezcle vigorosamente.
2. Determine el número de pozos que se van a utilizar. Retire del sujetaplacas las tiras que no se necesiten y devuélvalas a la bolsa de papel metalizado.
3. Agregue 100 µL de muestra o estándares a los pozos adecuados en duplicado.
NOTA: No diluya los estándares provistos. **Espere 10 minutos antes de proceder con el paso 4.**
4. Agregue 100 µL de conjugado de enzimas a cada pozo. Utilice una pipeta de canales múltiples para agregar rápidamente.
5. Incube a temperatura ambiente durante 10 minutos.
NOTA: Mantenga la placa alejada de las corrientes y fluctuaciones de temperatura.
6. Después de completar la incubación, retire el líquido de los pozos. Presione la placa sobre una toalla limpia que no deje pelusa para retirar cualquier líquido que haya quedado en los pozos.
7. Lave cada pozo con 300 µL de tamponado de lavado diluido. Para procedimientos de lavado manual, repita durante un total de 3 lavadas, invierta y seque con golpecitos entre cada lavada. Si se utiliza una lavadora de placas automática, lave la placa 3 veces con 300 µL de tamponado de lavado diluido. Después de terminar el último paso del lavado, presione la placa sobre una toalla limpia que no deje pelusa para retirar cualquier líquido que haya quedado en los pozos y seque el fondo de los pozos con una toalla que no deje pelusa para retirar cualquier líquido que haya quedado en la parte exterior de los pozos.
8. Agregue 100 µL de solución de sustrato a cada pozo. Utilice una pipeta de canales múltiples para tener mejores resultados.
9. Incube a temperatura ambiente durante 10 minutos. Periódicamente, agite ligeramente la placa.
10. Agregue 100 µL de solución quelante a cada pozo para detener la reacción. Utilice una pipeta de canales múltiples para tener mejores resultados. Mezcle agitando suavemente la placa.
11. Mida la absorbencia de cada pozo a 450 nm utilizando un lector de microplacas.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Calcule el promedio de los valores de absorbencia duplicados para cada estándar y muestra. Expresé la absorbencia media (B) de cada muestra y estándar como una fracción relativa a la absorbencia media del estándar 0.0 ng/mL (Bo). Haga esto dividiendo cada valor entre la absorbencia del estándar 0.0 ng/mL. (B/Bo) El estándar 0.0 ng/mL será 1.0.

Prepare una curva de calibración graficando $\logit(B/Bo)$ frente a $\log(\text{concentración de cloranfenicol})$ para cada uno de los estándares. Utilizando el valor de $\logit(B/Bo)$ para cada muestra, la concentración de cloranfenicol en cada muestra como ng/mL se puede leer o calcular de la curva. Para explicar el procedimiento de extracción, el resultado de debe multiplicar por 500 para expresar el resultado como tejido pg/g (ppt).

ESPECIFICIDAD Y SENSITIVIDAD

La especificidad se determinó probando la reactividad cruzada de los compuestos relacionados.

Compuesto	Reactividad cruzada
Cloranfenicol	100%
Succinato de cloranfenicol	130%
Glucorónido de cloranfenicol	26%
Base de cloranfenicol	< 0.01%
Florfenicol	< 0.01%
Tianfenicol	< 0.01%

El límite de detección inferior es aproximadamente 0.02 ng/mL. Esta es la concentración más baja que se puede determinar como significativamente diferente del estándar cero bajo condiciones ideales. Tomando en cuenta la extracción, esto es equivalente a 10 ppt (pg/g) en tejido de camarón. Se debe tener cuidado para seleccionar un valor de detención adecuado.

Los índices de recuperación típicos utilizando el procedimiento de extracción recomendado son $\geq 80\%$.

SERVICIO AL CLIENTE

La Asistencia al Cliente y el Servicio Técnico de Neogen se pueden contactar a la información que está más abajo. Entrenamiento sobre este producto y todos los kits de prueba de Neogen, están disponible.

INFORMACIÓN DISPONIBLE SOBRE FICHAS DE SEGURIDAD DE LOS MATERIALES

Puede obtener fichas de seguridad de los materiales para este equipo analítico y para todos los equipos analíticos Neogen de seguridad de los alimentos en www.neogen.com, o llamando a los números +1 800/234-5333 ó +1 517/372-9200.

GARANTÍA

Neogen Corporation no ofrece garantía de ninguna especie, explícita o implícita, salvo la de que los materiales utilizados en sus productos son de calidad satisfactoria. Si algún material es defectuoso, Neogen facilitará un producto sustitutivo. El comprador asume todo el riesgo y toda la responsabilidad dimanantes del uso de este producto. No hay garantía de comerciabilidad de este producto, ni de adecuación del mismo a ningún propósito. Neogen no se hace responsable de ningún daño, con inclusión de daños especiales o consecuentes, ni de gastos derivados directa o indirectamente del uso de este producto.

TESTING KITS AVAILABLE FROM NEOGEN

Natural Toxins

- Aflatoxin, DON, Ochratoxin, Zearalenone, T-2/HT-2 Toxins, Fumonisin, Histamine

Foodborne Bacteria

- *E. coli* O157:H7, *Salmonella*, *Listeria*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis*

Sanitation

- ATP, Yeast and Mold, Total Plate Count, Generic *E. coli* and Total Coliforms, Protein Residues

Food Allergens

- Almonds, Crustacea, Eggs, Gliadin, Hazelnut, Lupine, Milk, Mustard, Peanut, Sesame, Soy, Walnut

Genetic Modification

- CP4 (Roundup Ready®)

Ruminant By-products

- Meat and Bone Meal, Feed



North America

Neogen Headquarters

620 Leshler Place, Lansing, MI 48912 USA
800/234-5333 (USA/Canada) or 517/372-9200
Fax: 517/372-2006 • foodsafety@neogen.com
www.neogen.com

Europe, Middle East and Africa

Neogen Europe

The Dairy School, Auchincruive, Ayr
KA6 5HW Scotland, UK
+ 44 (0) 1292 525 600 • Fax: + 44 (0) 1292 525 601
info_uk@neogeneurope.com
www.neogeneurope.com

Mexico

Neogen Latinoamérica

Darwin No. 83, Col. Anzures, México, 11590 D.F.
(55) 5254-8235, (55) 5203-0111, (55) 5531-2837
Fax: (55) 5531-1647 • informacion@neogenlac.com
www.neogen.com

Brazil

Neogen do Brasil

Rua: Alberto Guizo 760, Distrito Industrial João
Narezzi, Indaiatuba – SP Brasil, Cep: 13.347-402
Tel: +55 19 3935.3727
info@neogendobrasil.com.br • www.neogen.com